

FORMATION OF MONOCLONAL ANTIBODY

Patent number: JP5236990
Publication date: 1993-09-17
Inventor: IWAKURA MASAHIRO; others: 02
Applicant: AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL
Classification:
- international: C12P21/08; G01N33/531; G01N33/577
- european:
Application number: JP19910350835 1991.1211
Priority number(s):

Abstract of JP5236990

PURPOSE: To simply form the monoclonal antibody against a compound having a low antigen-activity.
CONSTITUTION: In the formation of a specific monoclonal antibody, a complex dihydrofolic acid reductase (DHFR) having the objective compound on the side of its carbonyl terminal is formed, and an animal to be immunized is immunized, sensitized with the reductase (DHFR), and further subjected to the screening of the monoclonal antibody with the complex DHFR to produce a hybridoma cell producing the monoclonal antibody against the objective compound. The cell obtained as the result of the screening is used to form the objective monoclonal antibody.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-236990

(43) 公開日 平成5年(1993)9月17日

| (51) Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 序内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|-------------------------------|------------------|---------|--------------|----------------------|
| C 1 2 P 21/08 | | 8214-4B | | |
| G 0 1 N 33/531 | A | 8310-2J | | |
| 33/577 | B | 9015-2J | | |
| | | 7236-4B | C 1 2 N 5/00 | B |
| | | 8931-4B | 15/00 | A |
| 審査請求 有 請求項の数 1 (全 5 頁) 最終頁に続く | | | | |
| (21) 出願番号 | 特願平3-350835 | | (71) 出願人 | 000001144 |
| (22) 出願日 | 平成3年(1991)12月11日 | | | 工業技術院長 |
| | | | | 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号 |
| | | | (72) 発明者 | 巖倉 正寛 |
| | | | | 茨城県つくば市松代5丁目552棟2号 |
| | | | (72) 発明者 | 国分 友邦 |
| | | | | 茨城県つくば市松代5丁目511棟2号 |
| | | | (72) 発明者 | 大箸 信一 |
| | | | | 茨城県つくば市吾妻4丁目104棟302号 |
| | | | (74) 指定代理人 | 工業技術院繊維高分子材料研究所長 |

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体の作成方法

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 抗原活性の低い化合物に対するモノクローナル抗体の作成を簡便に行う。

【構成】 特異的なモノクローナル抗体の作成において、目的化合物をカルボキシル末端側に有する複合ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) を作成し、免疫動物を免疫感作し、さらに、複合DHFRを用いたモノクローナル抗体のスクリーニングを行い、目的化合物に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を得る。スクリーニングの結果得られた細胞を用いて目的のモノクローナル抗体を作成する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】特異的なモノクローナル抗体を作成するために免疫動物を免疫化する場合、ジヒドロ葉酸還元酵素のカルボキシル末端に目的化合物を結合した複合タンパク質を用いて免疫化することを特徴とするモノクローナル抗体の作成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下DHFR）のカルボキシル末端に目的化合物を結合した複合タンパク質を作成し、それを免疫用抗原として用いることを特徴とするモノクローナル抗体の作成方法に関するものである。本発明の産業上の利用分野としては、臨床検査及び医薬品製造の分野が上げられる。

【0002】

【従来の技術】生体内に存在する微量生体活性物質を特異的に検出し定量する方法として、抗原-抗体反応における免疫学的分子認識特性と放射性同位元素の放射能または酵素活性の高感度検出による定量特性を組み合わせた放射免疫測定法（RIA）及び酵素免疫測定法（EIA）が知られている。これら免疫測定法は血清など試料中の測定対象物質を高感度かつ比較的容易に定量できることから、測定対象物質の数が年々増加の一途をたっており、臨床検査など医療福祉の分野において一つの産業を形成しつつある。特にEIAはRIAが法的規制のある放射性同位元素を用いなければならない不便さがあるのに対し、酵素活性を検出手段に用いるため取扱いが容易であり、最近ではEIAによる測定法が普及しつつある。

【0003】モノクローナル抗体とは、1個のB細胞または1個の細胞より分裂によって生じた均一な細胞集団によって産生された抗体であり、抗原分子の特定の抗原決定基のみを認識する。また、抗体の特異性のみならず、クラス、サブクラス、親和力などの性質も全く均一な抗体の集団である。従って、モノクローナル抗体の有効性は、抗体の均一性に求めることができ、この性質を利用することにより各種の免疫測定を行うときに、抗体の不均一性に由来する種々の障害を原理的に取り除くことができるという特徴を有する。

【0004】モノクローナル抗体を用いた免疫測定法を確立する場合、測定対象生体活性分子に対して特異的に結合するモノクローナル抗体を調製しなければならない。一般に、モノクローナル抗体を作成する場合は、免疫動物を免疫感作し、抗体を産生するようになった動物の脾臓細胞を取り出し、これをミエローム細胞などの試験管内で培養できる細胞と融合した細胞（ハイブリドーマ）をつくり、スクリーニングして目的のモノクローナル抗体をつくるハイブリドーマを選び出し、得られたハイブリドーマを利用して、目的のモノクローナル抗体の調製を行う。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】モノクローナル抗体を作成する場合、種々の問題点が上げられている。

【0006】第1は、分子量数千もしくはそれ以下の化合物は抗原活性が極めて低いことである。そのため一般には、目的化合物をウシ血清アルブミン（BSA）等の高分子担体に化学結合させ、抗原活性を高めた複合体を調製し、それを利用して免疫感作が行われている。しかしながら、目的化合物の高分子担体への結合には、グルタルアルデヒドなどの2価性架橋試薬が用いられ、架橋反応の効率が低いことその他に、架橋反応の結果、高分子担体に結合した化合物自身の構造が目的とした構造と異なる可能性が考えられること、また、高分子担体状の結合部位が特定できないことなど、原理的に避けることが困難な問題がある。

【0007】第2の問題は、目的のモノクローナルをつくる特定のハイブリドーマのスクリーニングが煩雑であることである。とくに、目的化合物を結合する高分子担体に対しても多くの種類の抗体が作られることから目的化合物に対するモノクローナル抗体の産生をスクリーニングする場合は、免疫感作に用いられた目的化合物を結合した高分子複合体を用いることができず、免疫感作用及び抗体検出用の2種類の異なった抗原を準備しなければならない。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記問題点を本質的に解消する手段に関して鋭意研究を行い、既に本発明者らが、枯草菌及び大腸菌の2種類のDHFRを用いて、それぞれのカルボキシル末端に目的化合物を効果的に結合する方法を種々開発していることに着目した。すなわち、目的化合物がDHFRのカルボキシル末端側に結合した複合タンパク質を作成し、これを用いて免疫動物を免疫感作すること、及び、免疫感作した複合DHFRと異なり目的化合物を結合したDHFRもしくは高分子担体を利用して行うハイブリドーマのスクリーニング方法を考案し、上記問題点を解消できることを示した。

【0009】

【発明の構成】本発明のモノクローナル抗体の作成方法は、目的化合物をカルボキシル末端側に有する複合DHFRを作成し、これを免疫感作用抗原またはハイブリドーマのスクリーニング用抗原として用いることに特徴を有する。

【0010】本発明は、（1）目的化合物をカルボキシル末端側に有する複合DHFRの作成、及び（2）複合DHFRを用いたモノクローナル抗体の作成により構成される。

【0011】目的化合物をカルボキシル末端側に有する複合DHFRの作成は種々の方法で作成できる。

【0012】目的化合物がペプチドである場合は、遺伝

子工学的に作成することができる。目的ペプチドをカルボキシ末端側に有するDHFR融合タンパク質の遺伝子工学的的手法による作成方法(特許公告平3-64112号公報、特許公告平3-49559号公報、特許公告平3-64111号公報)及び目的融合タンパク質の宿主菌からの精製分離方法(特許公告平3-33315号公報、特許公告平1-555108号公報、特許公告平3-646517号公報)に関しては、本発明者らによって開発されており、その方法に従うことにより、高度精製した目的融合タンパク質を入手することができる。なお、DHFRとの融合タンパク質の作成方法は、枯草菌及び大腸菌由来のDHFRを用いた方法について公知であるが、各種生物由来のDHFRを用いた場合も可能であることを容易に類推することができることから、本発明は、DHFRの起源に限定されない。

【0013】融合タンパク質の生成は、目的ペプチドを暗号化するDNAを合成、もしくは単離し、これを本発明者らが既に開発している融合タンパク質作成用ベクターに組み込み、目的融合タンパク質を大腸菌などの宿主菌体で発現させる。宿主菌体を培養、これから、発現した融合タンパク質をDHFR活性を目安に高度に精製する。目的ペプチドに関しては、大腸菌のDHFRを用いた場合、200アミノ酸程度よりなるプロラクチンとの融合タンパク質の発現生産に関して成功していることから(特許公開平2-142479号公報)、任意長さのペプチドを用いることができる。

【0014】目的化合物が上記に述べた方法で作成できない場合は、DHFRのカルボキシル末端にシステイン残基を導入したDHFR(平成3年11月26日特許出願「新規なジヒドロ葉酸還元酵素及び改変ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子」)を利用することにより達成できる。

【0015】この目的に利用されるDHFRは、その酵素タンパク質のカルボキシ末端側にシステイン残基をカルボキシ末端とする数個のアミノ酸残基から成るアミノ酸配列が導入された構造をとる。このDHFR中のカルボキシ末端のメルカプト基の反応性は高く、中性(pH 7.0)、室温(15~30℃)での、5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)を用いたチオール-ジスルフィド交換反応では迅速に反応し約数分でその反応を完結することが既に示されている(平成3年11月26日特許出願「新規なジヒドロ葉酸還元酵素及び改変ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子」)。従って、目的化合物のチオール誘導体を作成した場合、チオール-ジスルフィド交換反応を利用することにより、目的化合物をDHFRのカルボキシル末端に結合することが可能である。

【0016】更に、チオール(SH基)の特異的反応としては、この他に(I)金属イオン及び有機水銀化合物との反応、(II)アルキル化反応などが知られており(参考文献として、例えば「SH基の化学修飾」石黒正恒著、学会出版センター、1978年)そのような反応

を利用することにより、目的化合物のそれぞれの反应用誘導体をDHFRのカルボキシル末端に結合することが可能である。

【0017】上記に述べた方法により作成した複合タンパク質を用いた免疫動物の免疫感作は、通常に行われる免疫感作の方法を用いて行うことができる。すなわち、融合タンパク質をアジュバンドと混合し、日をおいて数回に分けて注射した後、採血し、血液中から抗体を分離し、その抗体価を調べることにより行うことができる。

10 【0018】目的化合物をカルボキシ末端側に有する複合DHFRを免疫感作用抗原として用いることの利点としては、①DHFR酵素活性を利用することにより高度に精製することができ、不純物に由来する不純な抗体の産生誘導を抑えることができる。②複合タンパク質が均一である。③化合物の一部がDHFRのカルボキシ末端に結合している以外は、その他の構造は目的の構造である。④DHFRが細菌由来であり、免疫動物との類縁性が非常に離れていることから、抗体産生に増強効果が期待できる。などが上げられる。

20 【0019】本発明の実施例では、アミノ酸5残基からなり種間の特異性がないため抗原活性が極めて弱いロイシンエンケファリン(LEK)をとりあげ、LEK換算として1.4μgのごく少量で有効に免疫感作が行われることを示し、本発明が優れていることを示している。以下に、LEKを例にとり、本発明のモノクローナル抗体の作成手順を説明する。LEK以外の化合物がカルボキシル末端に結合したDHFRを用いる場合も全く同様の作成手順を適用できる。

30 【0020】免疫感作は、枯草菌由来のDHFRのカルボキシ末端にLEKを連結させた融合タンパク質(bsDHFR-LEK)を調製し、これを免疫感作用実験動物としてもちいたBALB/cメスマウスにbsDHFR-LEKを0.5mg/mlの濃度になるように生理食塩水で希釈した後、等容量の完全フロイントアジュバンド(1回目)もしくは不完全フロイントアジュバンド(2及び3回目)と混合し、マウス腹腔内に3週間ごと3回投与することにより行った。最終注射後14日目には有効な抗体産生が観察される。

40 【0021】抗体産生は、マウス尾静脈から採血し、血清を分離し、これを固相酵素免疫測定法(ELISA)により力価を測定することにより行うことができる。本実施例では、以下の方法を用いたが、ELISAの方法およびそれに用いられるLEKを固定化したタンパク質によって本発明は制限されない。

50 【0022】力価測定用高分子結合抗原としては、大腸菌由来のDHFRのカルボキシル末端にLEKを連結させた融合タンパク質(ecDHFR-LEK)を用いることができる。bs-DHFRとec-DHFRの抗原性は互いに異なり、bs-DHFRを免疫感作して作られる抗体はec-DHFRを認識できないことから、L

EK部分に対してのみの抗体を特異的に検出できる。

【0023】 b s DHFR-L EKを免疫感作した時のL EK抗体の力価測定を以下の方法で行う。e c DHFR-L EKを、0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液 pH9.5で1-10 μ g/mlの濃度に希釈する。これを、ELISA用の市販の96穴マイクロプレートにウェル当り 50 μ lずつ分注し、2時間以上4℃で静置し、ウェルに吸着させる。水で3回洗浄後 0.5%BSA-0.025M EDTA- 0.15M NaCl-10mM リン酸緩衝液pH7.5(BEPBS)でウェルを満たし1時間以上室温で静置する。続いて 0.05% Tween 20-0.15 M NaCl-10mM リン酸緩衝液 pH7.5 (TPBS) と水で3回ずつプレートを洗浄した後よく水を切って -20℃で使用直前まで保存する。測定する血清を1ウェル当り50 μ l ずつタンパク質固定化プレートに分注し、1時間室温で反応後TPBSと水で3回ずつ洗浄した後、50 μ l ずつ400倍に0.05%Tween 20-BEPBS (TBPBS)で希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG+IgM抗体溶液を分注する。続いて1時間室温で静置後同様にプレートを洗浄しよく水を切った後、50 μ l ずつ各ウェルに0.25mg/ml ABTS (2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリル)-6-スルホン酸)-0.0025% H_2O_2 -0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) を加え発色反応を行なう。反応は0.5%のSDS水溶液 150 μ l を加えることで停止させ、405nmの吸収増加をコロナ社のマイクロプレートリーダーで測定し、プレートに残存しているマウスガンマグロブリンを定量する。この方法により、L EKに対する抗体のみを検出でき、L EK部分に対して動物が免疫感作されているかを知ることができる。なお、e c DHFR-L EKで免疫感作する場合、b s DHFR-L EKを用いて同様に行うことができる。

【0024】ハイブリドーマの作成は、細胞融合はKohlerとMilsteinの方法に従って行うことができる。実施例では、3回目の免疫感作を行ったマウスのうちELISAで抗L EK活性が強く検出された1匹について、3回目の感作後3週間目に尾静脈内に17 μ g のDHFR-L EKを含む生理食塩水0.1mlを注射し免疫系を刺激した後4日目に脾臓を摘出した。細胞融合は分散化した脾臓細胞とマウス骨髓種細胞x63-Ag8-653株とを5:1の割合で混合し、50%PEG-RPMI 1ml中で細胞融合を行った。融合後細胞分散液は 695個のウェルに100 μ lずつ分注し RPMI-HAT-15%FCS培地でハイブリドーマの選択を行った。ハイブリドーマのクローニングは希釈法で行った。

【0025】クローニングしたハイブリドーマがL EKに対する抗体を産生しているかの有無は、e c DHFR-L EKを固定化した上記ELISAに準じて行なう。e c DHFR-L EKをウェルに吸着させ、3回洗浄後、測定するものとして、ハイブリドーマの細胞培養液を用いる。

【0026】モノクローナル抗体のグロブリンクラス同定に用いたELISAは、ザイメッド社の免疫グロブリン

ンクラス同定用抗体キットを用い処方に従って行なうことができる。また、抗L EKモノクローナル抗体のL EK認識部位を調べるために行った各種ペプチドに対する免疫交差活性測定のためのELISAは以下に行なう。b s DHFR-L EK融合タンパク質100 μ g/mlで固定化処理したマイクロプレートの各ウェルに、20 μ g/mlの抗L EKモノクローナル抗体50 μ lとTBPBSで段階希釈した濃度のペプチド溶液50 μ lを分注し、2時間室温で反応後、TPBSと水でプレート洗浄を行い、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG+IgM抗体溶液を用い前述のごとくプレートに残存した抗L EKモノクローナル抗体量を発色定量する。本発明の実施例では、最終的に、2種類のL EKに対するモノクローナル抗体が得られ、本発明の方法が有効であることが確かめられた。

【0027】

【実施例】次に本発明の実施例をしめす。

実施例1 DHFR-L EK融合タンパク質の調製

枯草菌または大腸菌のDHFRの遺伝子にL EKを暗号化した遺伝子を連結させて作製したDHFR-L EK遺伝子を有するプラスミドを含有する大腸菌を遺伝子操作により調製した(特許公告平1-48754、特許公告平3-55108)。これら大腸菌についてそれぞれ液体培養を行い、得られた菌体を超音波処理、DEAE-トヨパール650Mイオン交換クロマトグラフィー及びトヨパールHW55ゲルクロマトグラフィーでDHFR-L EKタンパク質分画を精製純化し、SDS電気泳動で均一なバンドを示す枯草菌及び大腸菌DHFR-L EK融合タンパク質を得た。

【0028】実施例2 b s DHFR-L EK融合タンパク質の免疫感作

マウス1匹当りb s DHFR-L EK50 μ g投与群3匹と10 μ g投与群3匹の3回免疫感作後の血清を分離しその抗体価を測定した。e c DHFR-L EKをプレートに固定化して行ったELISAでは血清中の抗体価に両群の差はみられなかったが、L EKをBSAにグルタルアルデヒド法で結合させて調製したBSA-L EKに対しては50 μ g投与群のマウス2匹の血清にのみL EK結合活性の存在が認められた。このことは1) b s DHFR-L EKの3回投与により抗L EK抗体を発現させるためにはb s DHFR-L EK 50 μ g (L EK含量: 約1.4 μ g) をマウスに投与すれば、DHFR1分子に1分子のL EKが結合した融合タンパク質でもL EKに対する抗体の産生を惹起できること。2) DHFRはカルボキシル末端に遺伝子操作で元来抗原活性のない低分子量ペプチドを結合させることにより抗原性を付与できる有用な担体になりうることを示唆している。

【0029】実施例3 抗体産生ハイブリドーマ細胞の調製

3回目の免疫感作を行ったマウスのうちELISAで抗

7

LEK活性が強く検出された1匹について、3回目の感作後3週間目に尾静脈内に17 μ gのbcDHFR-LEKを含む生理食塩水0.1mlを注射し免疫系を刺激した後4日目に脾臓を摘出した。細胞融合は分散化した脾臓細胞とマウス骨髄種細胞x63-Ag8-653株とを5:1の割合で混合し、50%PEG-RPMI 1ml中で細胞融合を行った。融合後細胞分散液は695個のウェルに100 μ lずつ分注しRPMI-HAT-15%FCS培地でハイブリドーマの選択を行った。ハイブリドーマのクローニングは希釈法で行った。695個のウェルに分散させた細胞分散液より、HAT選択により146個のウェルでハイブリドーマによるコロニーの形成が観察された。bsDHFR-LEKを96穴マイクロプレートに固定化して行ったELISAの結果146個のウェルのうち11個のウェルの培養液にbsDHFR-LEK結合活性が認められた。これらのウェルについてクローニングを行いハイブリドーマを純化して得た10株について、ecDHFR-LEKでプレートを固定化して行ったELISAにより3株(N0.36, N0.74, N0.113)がLEKに対して抗体結合活性を有していることが判明した。このことはDHFRが抗LEK抗体調製用担

10

20

【0030】実施例4 得られたモノクローナル抗体のサブクラスの同定。

bsDHFR-LEK結合活性が認められた10株(ecDHFR-LEKとの結合活性を示した3株を含む)について、産生しているガンマグロブリンクラス同定のためにELISAで判別したところ、10株のうち7株がIgG₁κタイプであること、残り3株がIgMを産生していることがわかった。

【0031】実施例5 得られたモノクローナル抗体、bsDHFR-LEK-36及び-74抗体、の免疫交差活性

30

8

LEKの対するモノクローナル抗体の免疫交差性を調べるため種々のペプチドペプチド及びタンパク質についてELISAを行った。その結果、bsDHFR-LEK-36及び-74抗体は、LEKに対し 10^{-7} Mから 10^{-4} Mの濃度範囲で用量反応曲線を示し、IC₅₀はそれぞれ 3.74×10^{-6} M及び 4.66×10^{-6} Mであった。なおbsDHFR-LEK-No.113抗体については検討していない。このことはbsDHFR-LEKを用いた定量用ELISAの可能性を示唆している。両抗体の主要なLEK認識部位は、両抗体がロイシンの代わりにメチオニンをカルボキシル末端に持つメチオニンエンケファリンに対して弱い免疫交差活性を示した一方、LEK-NH₂やアミノ末端側にLEKのアミノ酸配列を有する α -neoendorphinに対して全く交差活性を示さなかったことから、カルボキシル末端側にあるロイシン残基の側鎖部分及びカルボキシル基であることが示された。また、両抗体はD-, L-ロイシン及びD-Ala², D-Leu⁵-enkephalinに対しても交差活性を示さなかったは、ロイシン残基の不斉性を認識しているとともにLEKの他の部位にも認識部位が存在していることを示唆している。このことは1位のチロシン残基をスルホン化したTyr(sul)¹-enkephalinに対する交差活性が両抗体で異なっていたことから支持される。さらに、ecDHFR-LEKに対して免疫交差活性を示した反面、LEKをカルボキシル末端に結合していないbsDHFRもしくはecDHFRとは反応しなかったことから、両抗体はbsDHFR-LEKのLEK部分を特異的に認識している抗体であることが明らかになった。

【発明の効果】本発明に従えば、抗原活性の極めて低い化合物に対するモノクローナル抗体の作成を簡便に行うことができる。また、このことは、モノクローナル抗体を用いた種々の種々の分析に貢献することが大である。

フロントページの続き

| (51) Int. Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | FI | 技術表示箇所 |
|----------------------------|------|----------|---------------|--------|
| G 0 1 N 33/577 | A | 9015-2 J | | |
| // C 0 7 K 15/28 | | 7731-4 H | | |
| C 1 2 N 5/20 | | | | |
| 15/06 | | | | |
| 15/62 | | | | |
| C 1 2 P 21/02 | C | 8214-4 B | | |
| (C 1 2 P 21/08 | | | | |
| C 1 2 R 1:91) | | | | |
| (C 1 2 P 21/02 | | | | |
| C 1 2 R 1:19) | | | | |
| | | 8931-4 B | C 1 2 N 15/00 | C |